

ARTIGOS ORIGINAIS CONCISOS

Carvedilol: Relação Entre a Actividade Antioxidante e Inibição da Transição de Permeabilidade Mitochondrial [4]

PAULO J. OLIVEIRA *, TELMA ESTEVES **, ANABELA P. ROLO **, PEDRO MONTEIRO ***, LINO GONÇALVES ***, CARLOS M. PALMEIRA **, ANTÓNIO J. MORENO

* Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Unidade de Investigação Básica em Cardiologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

** Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

*** Unidade de Investigação Básica em Cardiologia, Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Rev Port Cardiol 2003;22 (1):55-62

RESUMO

Objectivos: A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é um evento associado a estresse oxidativo severo (por exemplo, durante isquémia e reperfusão do miocárdio) e acumulação excessiva de cálcio mitocondrial, podendo mesmo levar a morte celular. Neste estudo comparou-se o efeito do Carvedilol (CV) na TPM cardíaca induzida por cálcio/fosfato (Ca/Pi) e cálcio/carboxiatractilato (Ca/Catr). Para a indução da TPM por Ca/Pi, o estresse oxidativo tem um papel importante, levando a oxidação de grupos tiólicos proteicos mitocondriais, em contraste com o efeito do Ca/Catr, onde essa oxidação é secundária à indução da TPM e não é motivada por estresse oxidativo.

Materiais e métodos: As mitocôndrias foram isoladas a partir do coração de rato e avaliaram-se parâmetros relacionados com a indução da TPM (n=5 para cada indutor): entumescimento mitocondrial e oxidação dos grupos tiólicos proteicos (ambos por espectrofotometria).

Resultados: Com Ca/Pi, o CV protegeu a mitocôndria da indução da TPM, nomeadamente na sua forma deletéria de alta condutância. Este efeito evidenciou-se pela diminuição do entumescimento mitocondrial. Este efeito foi simultâneo com a inibição da oxidação dos grupos tiólicos proteicos

ABSTRACT

Carvedilol: Relation Between Antioxidant Activity and Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition

Objectives: The mitochondrial permeability transition (MPT) is an event related to severe oxidative stress (for example, during myocardial ischemia and reperfusion) and excessive mitochondrial calcium accumulation, also being implicated in cell death. In this study, we compared the effect of carvedilol on the cardiac MPT induced by calcium and phosphate (Ca/Pi) and calcium/carboxyatractyloside (Ca/Catr). Oxidative stress plays a major role in MPT induction by Ca/Pi, leading to the oxidation of protein thiol groups, in contrast with Ca/Catr, where such oxidation is secondary to MPT induction and is not caused by oxidative stress.

Materials and methods: Mitochondria were isolated from rat hearts and parameters related to MPT induction were evaluated (n=5 for each inducer): mitochondrial swelling and oxidation of protein thiol groups (both measured by spectrophotometry).

Results: Using Ca/Pi, carvedilol protected mitochondria from MPT induction, particularly in its high conductance form. Its effect was demonstrated by analyzing the decrease in mitochondrial swelling amplitude. Simultaneously, we observed

mitocondriais ($p < 0.001$). O CV não mostrou efeitos protectores com Ca/Catr.

Conclusões: O CV protegeu a mitocôndria cardíaca da TPM, mas apenas quando a oxidação dos grupos tiólicos proteicos foi causa e não consequência da TPM. Estes resultados mostram claramente que, durante agressões ao miocárdio (durante a isquémia/reperfusão, por exemplo), o efeito protector do CV é primariamente devido a um efeito antioxidante, inibindo a produção e os efeitos das espécies reactivas de oxigénio.

Palavras-Chave

Carvedilol; Mitocôndria; Estresse oxidante; Transição de permeabilidade mitocondrial

inhibition of protein thiol group oxidation ($p < 0.001$). By contrast, carvedilol did not show any protective effect with Ca/Catr.

Conclusions: Carvedilol was only effective against the MPT when the oxidation of protein thiol groups was the cause and not the consequence of the MPT phenomenon. The results clearly show that during myocardial aggressions (ischemia and reperfusion, for example), the protective effect of carvedilol is primarily due to an antioxidant mechanism, inhibiting the production and effects of reactive oxygen species.

Key words

Carvedilol; Mitochondria; Oxidative stress;

INTRODUÇÃO

O carvedilol (CV) é um antagonista beta-adrenérgico, utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca, hipertensão e infarte do miocárdio. Clinicamente, o carvedilol apresenta a vantagem de ter uma marcada actividade antioxidante⁽¹⁾.

A mitocôndria cardíaca, local da produção da grande maioria da energia utilizada pelo miocárdio, tem um papel importante na recuperação do cardiomiócito após eventos patológicos, como a isquémia seguida de reperfusão (I/R). A I/R tem consequências graves ao nível celular, nomeadamente devido ao aumento da geração de espécies reactivas de oxigénio (ERO) no interior da célula⁽²⁾. Ao nível mitocondrial, uma das consequências mais danosas da I/R é a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), causada pela formação e abertura de poros proteicos na membrana interna mitocondrial, os denominados poros transitórios de permeabilidade mitocondrial (PTPM). Sabe-se que a entrada maciça de cálcio para o interior da mitocôndria, associada a um incremento da geração de ERO no interior daquele organelo, pode levar à formação dos PTPM, rompendo a barreira de impermeabilidade característica (e necessária) da membrana interna mitocondrial (para uma revisão, ver⁽³⁾). A TPM provoca a despolarização mitocondrial, perdendo este organelo a capacidade de produção de energia e a capacidade de tomada de cálcio. Muito frequentemente, a TPM está tam-

INTRODUCTION

Carvedilol is a beta-adrenergic antagonist used in the treatment of congestive heart failure, hypertension and myocardial infarction. Clinically, carvedilol has the advantage of possessing marked antioxidant activity⁽¹⁾.

Cardiac mitochondria, in which most of the energy used by the myocardium is produced, play an important role in cardiomyocyte recovery after pathological events, such as ischemia followed by reperfusion (I/R). I/R has serious consequences at the cellular level, mainly due to the increased production of reactive oxygen species (ROS) within the cell⁽²⁾. At the mitochondrial level, one of the most harmful effects of I/R is the mitochondrial permeability transition (MPT), caused by the formation and opening of protein pores, known as mitochondrial permeability transition pores (MPTP), in the inner mitochondrial membrane. It is known that a massive calcium influx into the mitochondrion, together with increased generation of ROS inside the organelle, can lead to the formation of MPTPs, disrupting the normal (and necessary) impermeability barrier of the internal mitochondrial membrane (for a review, see⁽³⁾). The MPT causes mitochondrial depolarization, and the organelle loses the ability to produce energy and to take up calcium. Frequently, the MPT is also associated with an increase in mitochondrial volume, which leads to rupture of the outer membrane and even to apoptosis (and, ultimately, necrosis) of the car-

bém associada a um aumento de volume mitocondrial, que leva ao rompimento da membrana externa e mesmo a apoptose (ou, em última análise, a necrose) do cardiomiócito, por libertação de factores apoptóticos, como o citocromo *c*⁽⁴⁾. A susceptibilidade à TPM já foi sugerida como um factor determinante na recuperação do cardiomiócito após a I/R⁽⁵⁾.

Neste estudo comparou-se o efeito do CV na TPM cardíaca induzida por cálcio/fosfato (Ca/Pi) e cálcio/carboxiatractilato (Ca/Catr). A indução da TPM por Ca/Pi é motivada pela incremento de estresse oxidativo no interior da mitocôndria, levando a oxidação de grupos tiólicos proteicos⁽⁶⁾, em contraste com o efeito do Ca/Catr, onde essa oxidação é secundária à indução da TPM e não é motivada por estresse oxidativo⁽⁷⁾.

Pelos resultados obtidos, demonstrámos que o CV inibe a TPM por um mecanismo puramente antioxidante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: O carvedilol foi obtido da Roche Farmacêutica (Portugal) e preparado em DMSO (dimetilsulfoxido). O volume final de solvente na câmara de reacção foi sempre inferior a 0.2 % do volume total e nunca mostrou ter qualquer efeito nos parâmetros medidos. Todos os outros compostos foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), à excepção da sonda fluorescente Calcium Green 5-N (Molecular Probes, Eugene, OR)

Animais: Ratos macho Wistar (n=5) foram usados durante as experiências. Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Requerimentos Europeus para a Pesquisa em Animais Vertebrados.

Isolamento da fracção mitocondrial cardíaca: Mitocôndrias cardíacas foram isoladas de acordo com um método previamente descrito⁽⁸⁾. A concentração de proteína mitocondrial foi determinada utilizando o método do biureto, utilizando BSA como padrão.

Seguimento do entumescimento mitocondrial: A acumulação excessiva de cálcio na mitocôndria, em condições pro-oxidantes, leva à TPM. Uma das consequências é o aumento de volume mitocondrial que pode ser seguido pelas variações da densidade óptica da suspensão mitocondrial medidas a 540 nm.

Determinação da oxidação de grupos tiólicos proteicos: Para este fim, utilizou-se a reacção específica do ácido 5,5'-ditio-bis-2-

diomyocyte, through release of apoptotic factors such as cytochrome *c*⁽⁴⁾. Susceptibility to the MPT has been suggested as a determining factor in cardiomyocyte recovery following I/R⁽⁵⁾.

In this study, we compared the effect of carvedilol on the cardiac MPT induced by calcium/phosphate (Ca/Pi) and by calcium/carboxyatractyloside (Ca/Catr). Induction of the MPT by Ca/Pi is caused by increased oxidative stress inside the mitochondrion, leading to oxidation of protein thiol groups⁽⁶⁾, in contrast to the effect of Ca/Catr, in which such oxidation is secondary to MPT induction and is not caused by oxidative stress⁽⁷⁾.

The results obtained demonstrate that carvedilol inhibits the MPT by a purely antioxidant mechanism.

METHODS

Materials: The carvedilol was obtained from Roche Farmacêutica (Portugal) and prepared in DMSO (dimethyl sulfoxide). The final volume of solvent in the reaction chamber was kept below 0.2 % of the total volume and showed no effect on the parameters being measured. All other compounds were acquired from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), except the fluorescent probe Calcium Green-5N (Molecular Probes, Eugene, OR).

Animals: Male Wistar rats (n=5) were used in the experiments. The experimental procedures were in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Scientific Purposes.

Isolation of the cardiac mitochondrial fraction: Cardiac mitochondria were isolated in accordance with a previously described method⁽⁸⁾. The concentration of mitochondrial protein was determined by the biuret reaction, using BSA as the standard.

Monitoring of mitochondrial swelling: In pro-oxidant conditions, the excessive accumulation of calcium in the mitochondrion leads to the MPT. One of the consequences of this is an increase in mitochondrial volume, which can be monitored by variations in the optical density of the mitochondrial suspension measured at 540 nm.

Determination of protein thiol group oxidation: For this purpose, the specific reaction of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with mitochondrial membranes was used. Readings were taken spectrophotometrically at 412 nm.

nitrobenzoico (DTNB) com as membranas mitocondriais. A leitura foi feita espectrofotometricamente a 412 nm.

Análise estatística: Os resultados são apresentados como médias \pm SEM de 7-8 preparações diferentes. A análise estatística foi efectuada por ANOVA, seguido de um pós-teste Student-Newman-Keuls. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A adição de cálcio a uma suspensão mitocondrial na presença de 5 mM fosfato provocou um rápido decaimento da densidade óptica da referida suspensão (*Fig. 1*, traço D), indicação do aumento de volume mitocondrial. Essa diminuição de densidade óptica foi totalmente inibida por ciclosporina-A (*Fig. 1*, traço A), um inibidor específico da TPM⁽⁹⁾. O CV mostrou ser capaz de inibir o aumento de volume mitocondrial (*Fig. 1*, traço C). Ao utilizar o par Ca/Catr (*Fig. 2*), observou-se novamente a di-

Statistical analysis: Results are presented as means \pm SEM of 7-8 different preparations. Statistical analysis was by ANOVA, followed by a Student-Newman-Keuls post-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The addition of calcium to a mitochondrial suspension in the presence of 5 mM phosphate caused a rapid decrease in the optical density of the suspension (*Fig. 1*, line D), an indication of increased mitochondrial volume. This reduction in optical density was completely inhibited by cyclosporin-A (*Fig. 1*, line A), a specific MPT inhibitor⁽⁹⁾. Carvedilol was shown to inhibit the increase in mitochondrial volume (*Fig. 1*, line C). When Ca/Catr was used (*Fig. 2*), the reduction in optical density that characterizes the MPT was again observed (*Fig. 2*, line D), and again was inhibited by cyclosporin-A (*Fig. 2*, line A). However, in contrast to

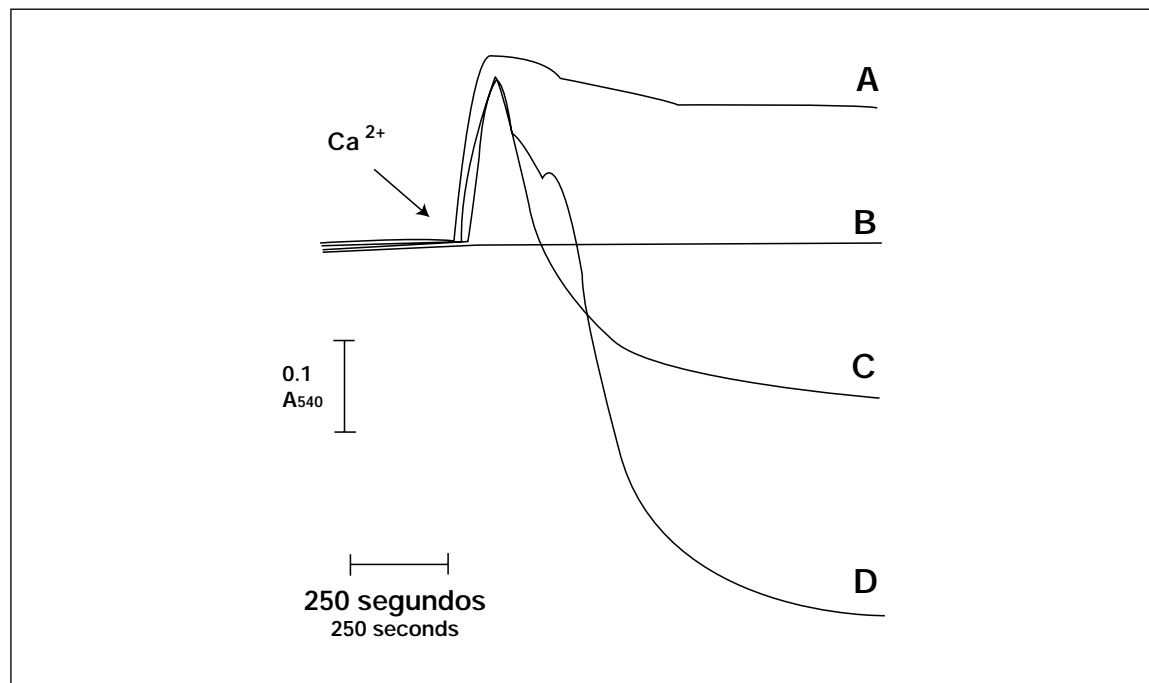


Fig. 1 Entumescimento mitocondrial medido como a variação da densidade óptica a 540 nm da suspensão mitocondrial. Um pulso de 500 μ M cálcio foi adicionado à suspensão mitocondrial (0.5 mg proteína mitocondrial /ml). O meio de reacção era constituído por 200 mM sacarose, 10 mM TRIS-MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 10 μ M EGTA, 4 μ M rotenona, 0.5 μ g oligomicina e 8 mM succinato (pH 7.4, 25°C). O carvedilol foi pré-incubado com a suspensão mitocondrial durante 3 minutos. A - cálcio + 1 μ M ciclosporina-A, B - nenhuma adição, C - cálcio + 20 μ M carvedilol, D - apenas cálcio. O registo é representativo de cinco preparações mitocondriais diferentes.

Fig. 1 Mitochondrial swelling measured as the variation in optical density of the mitochondrial suspension at 540 nm. A 500 μ M calcium pulse was added to the mitochondrial suspension (0.5 mg mitochondrial protein/ml). The reaction medium consisted of 200 mM sucrose, 10 mM Tris-Mops, 5 mM KH_2PO_4 , 10 μ M EGTA, 4 μ M rotenone, 0.5 μ g oligomycin and 8 mM succinate (pH 7.4, 25°C). The carvedilol was pre-incubated with the mitochondrial suspension for 3 minutes. A - calcium + 1 μ M cyclosporin-A, B - no addition, C - calcium + 20 μ M carvedilol, D - calcium only. The record is representative of five different mitochondrial preparations.

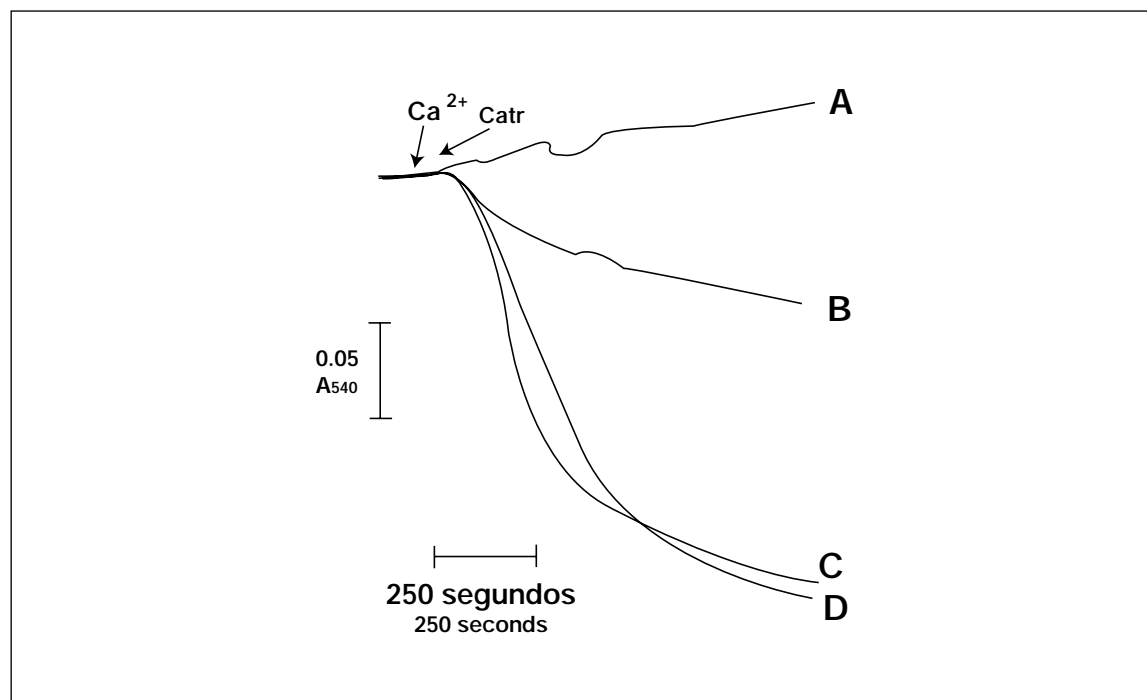


Fig. 2 Entumescimento mitocondrial medido como a variação da densidade óptica a 540 nm da suspensão mitocondrial. Um pulso de 100 μ M de cálcio foi adicionado à suspensão mitocondrial (0.5 mg proteína mitocondrial /ml), seguindo-se a adição de 20 μ M carboxiatractilósídeo (Catr). As restantes condições foram as mesmas da *Fig. 1*. A – cálcio + Catr + 1 μ M ciclosporina-A, B – apenas cálcio, C – cálcio + Catr + 20 μ M carvedilol, D – cálcio + Catr. O registo é representativo de cinco preparações mitocondriais diferentes.

Fig. 2 Mitochondrial swelling measured as the variation in optical density of the mitochondrial suspension at 540 nm. A 100 μ M calcium pulse was added to the mitochondrial suspension (0.5 mg mitochondrial protein/ml), followed by 20 μ M carboxyatractyloside (Catr). The remaining conditions were the same as in *Fig. 1*. A – calcium + Catr + 1 μ M cyclosporin-A, B – calcium only, C – calcium + Catr + 20 μ M carvedilol, D – calcium + Catr. The record is representative of five different mitochondrial preparations.

minuição de densidade óptica que caracteriza a TPM (*Fig. 2*, traço D), de novo inibida por ciclosporina-A (*Fig. 2*, traço A). Ao contrário do que aconteceu com CA/Pi, desta vez não houve inibição pelo CV (*Fig. 2*, traço C). Na ausência de Catr (*Fig. 2*, traço B), observou-se uma pequena diminuição de volume mitocondrial na presença de cálcio.

No que respeita à determinação dos níveis de grupos tiólicos proteicos reduzidos (P-SH), os resultados foram também opostos. Como se pode observar na *Fig. 3*, na presença de Ca/Pi, a quantidade de P-SH diminuiu ($p < 0.001$), indicando uma oxidação dos referidos grupos. Quer na presença de CV ($p < 0.01$), quer na presença de ciclosporina-A ($p < 0.01$), notou-se uma prevenção da referida oxidação, apesar dos valores nunca retomarem os valores controlo. O CV, quando incubado com a suspensão mitocondrial na ausência dos indutores não mostrou alterar o nível de P-SH.

A incubação da suspensão mitocondrial na presença de Ca/Catr mostrou também induzir uma redução dos níveis de P-SH ($p < 0.005$), am-

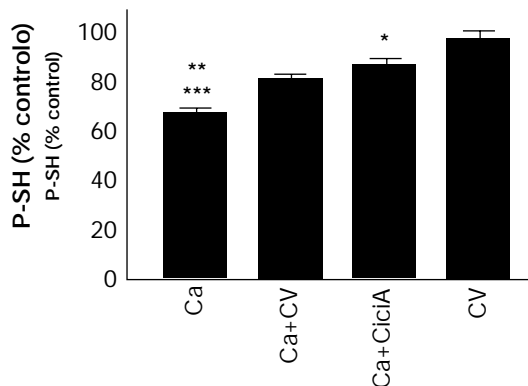
what happened with Ca/Pi, this time carvedilol had no inhibitory effect (*Fig. 2*, line C). In the absence of Catr (*Fig. 2*, line B), a small reduction in mitochondrial volume was observed in the presence of calcium.

When determining levels of reduced protein thiol groups (P-SH), the results were again different. As can be seen in *Fig. 3*, the quantity of P-SH decreased ($p < 0.001$) in the presence of Ca/Pi, indicating oxidation of these groups. However, oxidation was inhibited in the presence of carvedilol ($p < 0.01$) and cyclosporin A ($p < 0.01$), although the values did not return to those of the control. Carvedilol, when incubated with the mitochondrial suspension in the absence of inducers, did not alter P-SH levels.

Incubation of the mitochondrial suspension in the presence of Ca/Catr also induced a reduction in P-SH levels ($p < 0.005$), amplifying the action of calcium alone ($p < 0.05$). In contrast with cyclosporin-A, which was shown to return values to those found in the control (without additions), carvedilol did not prevent the effect of Ca/Catr.

Fig. 3 Medição de grupos tiólicos proteicos mitocondriais no estado reduzido. A indução da TPM foi efectuada nas condições da Fig. 1. * - $p < 0.05$ vs. controlo, ** - $p < 0.01$ vs cálcio (Ca) + carvedilol (CV) e vs cálcio + ciclosporina-A (Cic1A), *** - $p < 0.001$ vs controlo, $n = 5$.

Fig. 3 Measurement of mitochondrial protein thiol groups in a reduced state. Induction of the MPT was performed as for Fig. 1. * - $p < 0.05$ vs control, ** - $p < 0.01$ vs calcium (Ca) + carvedilol (CV) and vs calcium + cyclosporin A (Cic1A), *** - $p < 0.001$ vs control, $n=5$.



plificando a acção da adição de cálcio isoladamente ($p < 0.05$). Ao contrário da ciclosporina-A, que mostrou reverter os valores para os encontrados no controlo (nenhuma adição), o carvedilol não conseguiu prevenir o efeito do Ca/Catr.

DISCUSSÃO

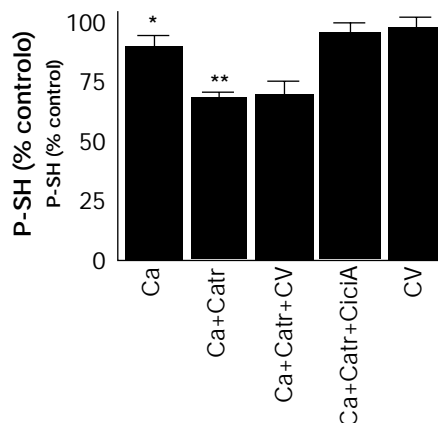
A análise dos resultados acima descritos permite concluir que o CV tem um efeito oposto quando os indutores da TPM utilizados são o Ca/Pi ou o Ca/Catr. Pela análise dos resultados obtidos ao nível da oxidação de P-SH com Ca/Catr, dir-se-ia que a TPM induzida por aqueles compostos seria motivada pela oxidação dos referidos grupos P-SH, um pouco à semelhança do que se encontra descrito para o Ca/Pi⁽⁶⁾. No entanto, tal não é verdade. Sabe-se que a indução da TPM por Ca/Catr é, na sua maioria, motivada pela inibição conformacional de uma das proteínas que fazem parte dos PTPM, o translocador de nucleótidos de ade-

DISCUSSION

Analysis of the above results leads to the conclusion that carvedilol has different effects depending on whether Ca/Pi or Ca/Catr is used to induce the MPT. Based on the results obtained for P-SH oxidation with Ca/Catr, it could be proposed that the MPT induced by these compounds is motivated by the oxidation of the P-SH groups, in a comparable way to that described for Ca/Pi⁽⁶⁾. This, however, is not the case. It is known that induction of the MPT by Ca/Catr is, for the most part, caused by the conformational inhibition of adenine nucleotide translocator (ANT), one of the proteins that are part of MPTPs. The conformation then assumed by ANT predisposes it to form these pores in the inner mitochondrial membrane, after linking with other mitochondrial proteins⁽⁷⁾. So, what caused the reduction in P-SH levels? The MPT leads to mitochondrial membrane depolarization due to dissipation of the proton grad-

Fig. 4 Medição de grupos tiólicos proteicos mitocondriais no estado reduzido. A indução da TPM foi efectuada nas condições da Fig. 2. * - $p < 0.05$ vs controlo, ** - $p < 0.005$ vs cálcio e vs cálcio + carboxiatractilosídeo (Catr) + ciclosporina-A (Cic1A), $n=5$.

Fig. 4 Measurement of mitochondrial protein thiol groups in a reduced state. Induction of the MPT was performed as for Fig. 2. * - $p < 0.05$ vs control, ** - $p < 0.005$ vs calcium and vs calcium + carboxyatractyloside (Catr) + cyclosporin-A (Cic1A), $n=5$.



nina (ANT). A conformação então tomada pelo ANT predispõe aquela proteína a formar os referidos poros na membrana interna mitocondrial, após ligação de outras proteínas mitocondriais⁽⁷⁾. Então, a que se deveu a diminuição dos níveis de P-SH? A TPM leva a despolarização membranar da mitocôndria devido à dissipação do gradiente protónico sustentado pela respiração mitocondrial⁽³⁾. Sabe-se que, em condições de desacoplamento mitocondrial, a quantidade de P-SH diminui drasticamente⁽¹⁰⁾. A acção da ciclosporina-A é determinante para se perceber qual a componente da oxidação de P-SH que é causa da TPM, e qual a componente que é consequência da despolarização dela resultante. A ciclosporina-A, ao inibir totalmente a TPM, impedirá a despolarização resultante daquela condição e, portanto, impede a componente de oxidação de P-SH daí resultante.

Em resumo, o CV inibiu a oxidação de P-SH mitocondriais quando os indutores foram Ca/Pi, mas não com Ca/Catr. Por seu lado, a ciclosporina-A (um composto que não apresenta capacidade antioxidante) apenas inibiu completamente a oxidação de P-SH quando o indutor foi cálcio + carboxiatractilosídeo. Utilizando Ca/Pi, a inibição foi parcial.

Os resultados permitem afirmar que o carvedilol inibe a transição de permeabilidade mitocondrial por um mecanismo antioxidante, impedindo a oxidação de P-SH que é iniciadora do processo de formação de poros proteicos que levam por fim à TPM.

É de esperar que o carvedilol forneça uma protecção significativa durante a hipoxia e reoxigenação do miocárdio, condições que sabe estarem associadas a uma aumento de cálcio e de estresse oxidativo na célula. O carvedilol mostrou uma protecção bastante acentuada, numa concentração (20 µM) que ronda as que se pensa poderem existir no músculo cardíaco durante terapia activa com carvedilol, sendo este um fármaco bastante lipofílico.

Os resultados descritos neste artigo permitem atribuir um papel importante à mitocôndria cardíaca durante processos patológicos do miocárdio. Permitem também sugerir que o efeito benéfico de certos fármacos com propriedades antioxidantes poderá passar por uma protecção da função mitocondrial cardíaca. A prevenção da TPM dependente de cálcio pelo carvedilol terá também importantes consequências ao nível da inibição de fenómenos de morte celular e prevenção da disfunção mito-

ient maintained by mitochondrial respiration⁽³⁾. It is known that, in conditions of mitochondrial uncoupling, the quantity of P-SH falls dramatically⁽¹⁰⁾. The action of cyclosporin A is crucial to an understanding of which component of P-SH oxidation is the cause of the MPT, and which component is the consequence of the resulting depolarization. Cyclosporin A, by completely inhibiting the MPT, would prevent the depolarization caused by the permeability transition and therefore the component of P-SH oxidation to which it gives rise.

To summarize, carvedilol inhibited oxidation of mitochondrial P-SH when the inducer used was Ca/Pi, but not with Ca/Ctr. Furthermore, cyclosporin-A (a compound that has no antioxidant ability) completely inhibited P-SH oxidation only when the inducer was calcium + carboxyatractyloside. With Ca/Pi, inhibition was partial.

The results confirm that carvedilol inhibits the mitochondrial permeability transition through an antioxidant mechanism, preventing the P-SH oxidation that initiates the process of protein pore formation that eventually leads to the MPT.

It is to be expected that carvedilol provides significant protection during hypoxia and reoxygenation of the myocardium, conditions that are known to be associated with an increase in calcium uptake and oxidative stress in the cell. Carvedilol was shown to provide a high degree of protection at a concentration (20 µM) that approximates that thought to exist in cardiac muscle during active therapy with carvedilol, a highly lipophilic drug.

The results presented in this article confirm the important role played by cardiac mitochondria during pathological myocardial processes. They also suggest that the beneficial effect of certain drugs with antioxidant properties may be due to the way they protect cardiac mitochondrial function. The prevention of calcium-dependent MPT by carvedilol also has important implications for the inhibition of cell death and prevention of mitochondrial dysfunction, since its induction is closely linked to the release of pro-apoptotic factors from the mitochondrial intermembrane space and to reduced mitochondrial ability to synthesize ATP.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Roche Farmacêutica (Portugal) for providing carvedilol.

condrial, uma vez que a indução daquele processo está intimamente ligado à libertação de factores pro-apoptóticos do espaço intermembranal mitocondrial e à perda da capacidade mitocondrial de síntese de ATP.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Roche Farmaceutica (Portugal), pela cedência de carvedilol.

Paulo J. Oliveira e Anabela P. Rolo são apoiados por Bolsas de Doutoramento da Fundação Para a Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência e do Ensino Superior (PRAXIS XXI/BD/21494/99 e PRAXIS XXI/BD/21454/99, respectivamente).

Pedido de separatas para:

Address for reprints:

PAULO J. OLIVEIRA

Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra
IBILI

Azinhaga de Santa Comba – Celas

3000-354 COIMBRA

Portugal

Paulo J. Oliveira and Anabela P. Rolo are funded by PhD fellowships from the Foundation for Science and Technology, Portuguese Ministry of Science and Higher Education (PRAXIS XXI/BD/21494/99 and PRAXIS XXI/BD/21454/99, respectively).

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, et al. Carvedilol, a New Vasodilator and Beta Adrenoceptor Antagonist, Is an Antioxidant and Free Radical Scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:92-8.
2. Baker JE, Felix CC, Olinger GN, Kalyanaraman B. Myocardial Ischemia and Reperfusion: Direct Evidence for Free Radical Generation by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1988;85:2786-9.
3. Crompton M, Costi A (1990). A Heart Mitochondrial Ca^{2+} -Dependent Pore of Possible Relevance to Reperfusion-Induced Injury. *Biochem J* 1990;266:33.
4. Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G. 1998. Mitochondrial Permeability Transition in Apoptosis and Necrosis. *Cell Biol Toxicol* 1998;14:141-5.
5. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD^+ and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *J Biol Chem* 2001;276:2571-5.

6. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Uncoupling or Inorganic Phosphate in the Presence of Ca^{2+} Is Dependent on Mitochondrial-generated Reactive Oxygen Species. *FEBS Lett* 1996;378:150-2.
7. Crompton M. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Role in Cell Death. *Biochem J* 1999;341:233-49.
8. Oliveira PJ, Coxito PM, Rolo AP, Santos DL, Palmeira CM, Moreno AJM. Inhibitory Effect of Carvedilol in the High-Conductance State of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Eur J Pharmacol* 2001;412:231-7.
9. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A Is a Potent Inhibitor of the Inner Membrane Mitochondrial Transition in Liver Mitochondria. *J Biol Chem* 1989;264:7826-30.
10. Freisleben HJ, Fuchs J, Mainka L, Zimmer G. Reactivity of Mitochondrial Sulfhydryl Groups Toward Dithionitrobenzoic Acid and Bromobimanes Under Oligomycin-inhibited and Uncoupling Conditions. *Arch Biochem Biophys* 1988; 266:89-97.